

Aus der Wilhelm-Conrad-Röntgen-Klinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Barth

**Zytostatische und synzytostatische Effekte
von L-Asparaginase im Ohrstanzlochtest**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Volkmar Haeger
aus Königsberg/Pr.

Gießen 1971

Aus der Wittenbergischen
der Jena-Library-Veranstaltung
Dresden, 1911, Nr. 12, 13, 14

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Wilhelm-Conrad-Röntgen-Klinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Barth

**Zytostatische und synzytostatische Effekte
von L-Asparaginase im Ohrstanzlochtest**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen



vorgelegt von
Volkmar Haeger
aus Königsberg/Pr.

Gießen 1971



Dekan: Prof. Dr. H. -G. LASCH
Referent: Prof. Dr. D. RINGLEB
Korreferent: Prof. Dr. H. LÖFFLER

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. Einleitung und Zielsetzung	2
II. Die verwendeten Zytostatika	4
A. L-Asparaginase	4
B. Aktinomyzin C	6
C. 5-Fluorurazil	6
D. Antimitotika	6
E. Zyklophosphamid	7
III. Versuchsanordnung	8
A. Allgemeines	8
1. Tiermaterial	8
2. Dosierung und Applikation der Zytostatika	8
3. Das Ohrstanzlochmodell	9
4. Statistische Methoden	10
B. Spezielle Versuchsdurchführung	11
IV. Ergebnisse	13
A. Absterberaten (Tab. 1-3; Abb. 1)	13
B. Körpergewichtszuwächse (Tab. 1, 4-9; Abb. 2)	18
C. Ohrstanzlochbefunde (Tab. 10-14; Abb. 3)	25
D. Korrelation zwischen Absterberaten, Körpergewichtszuwächsen und Ohrstanzlochbefunden (Tab. 15-16)	35
V. Diskussion	43
VI. Zusammenfassung	46
VII. Literaturverzeichnis	47
Lebenslauf	52

Abkürzungen:

AMC	Aktinomyzin C
5-FU	5-Fluorurazil
L-A	L-Asparaginase (L-Asparagin-Amidohydrolase)
PSH	Podophyllinsäurehydrazid
VBS	Vinblastinsulfat
ZPA	Zyklophosphamid

I. Einleitung und Zielsetzung

Die Arbeitsgruppe, der diese Veröffentlichung entstammt, beschäftigt sich mit der Wertigkeit synzytostatischer Effekte auf Normalgewebe im Verhältnis zu den synkarziolytischen (BAUER) Wirkungen auf Tumorgewebe bei Radiochemotherapie. Mit Hilfe genormter Versuchsmodelle (RINGLEB 1967) konnte gezeigt werden, daß radiologisch-zytostatische Kombinationsbehandlung mit Substanzen aus den Gruppen der Alkylantien, Antimitotika, Halogenpyrimidine und Antibiotika den zeitlichen Ablauf der verschiedenen Phasen der Strahlenreaktion verändern und an normalen granulativen, jugendlichen und germinativen Proliferationsgeweben zu meist additiv kumulierender Synzytostase führt, während in synkarziolytischer Hinsicht dies nicht, größtenteils sogar diesbezügliche Antagonismen zu beobachten sind (KRATZ; RINGLEB 1967, 1968; RINGLEB et al. 1968, 1969, 1970, 1971; SAUER; SCHNEIDER; SIPPEL; STECKENMESSER).

BUCH aus unserer Gruppe hatte kürzlich mit kombinierter L-Asparaginase-Strahlen-Behandlung begonnen und über deren Effekte auf das Hodengewicht, den Verlauf der Strahlenreaktion nach Applikation einer nekrotisierenden Dosis wie die Abheilungsgeschwindigkeit von Ohrstanzlöchern bei Mäusen berichten können. Es zeigte sich, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen L-Asparaginase (L-A) sowohl bei alleiniger Medikation, als auch bei Radiochemotherapie absolutes wie relatives Hodengewicht nicht reduzierte. Die Nachbehandlung mit L-A verzögerte die Strahlenreaktion eines mit nekrotisierender Strahlendosis teilbestrahlten Mäuseschwanzes wie auch die Abheilungsgeschwindigkeit von Stanzlöchern in Mäuseohren, letzteres geringfügig bei reiner L-A-Applikation, wesentlich deutlicher über die durch die ionisierende Strahlung allein bewirkte Verzögerung

hinaus bei L-A-Strahlen-Behandlung. Diese Befunde führten zu der Deutung, daß die gewebliche Reaktion bestrahlten Mesenchyms von einer Proteinsynthese begleitet oder von ihr abhängig sein könnte, die asparaginasesensibel ist und durch das Enzym gestört wird (RINGLEB et al. 1971 a).

Daß die Entwicklung granulierenden Bindegewebes nicht nur durch ionisierende Strahlung, sondern auch durch Radiomimetika in weitem Sinne (RINGLEB 1970) gestört werden kann, wurde vielfach berichtet (HOPPE; JUNGEHÜLSING; KARRER; KRATZ; RINGLEB 1967, 1968 c, 1969 a, 1970, 1971 b; SCHAUDIG; SIPPEL; STECKENMESSER). Unsere Aufgabe war es, nachdem BUCH überraschenderweise feststellen konnte, daß L-A die Verzögerung der Ohrstanzlochheilung durch Bestrahlung weiter verzögert, zu untersuchen, ob bei kombinierter Behandlung mit L-A und einem anderen Zytostatikum ein ähnlicher kumulativer Kombinationseffekt zu erreichen sein würde.

II. Die verwendeten Zytostatika

A. L-Asparaginase

Ein Sammelwerk über die bis Herbst 1969 bekannten Fakten über L-A haben GRUNDMANN et al. 1970 herausgegeben. In den folgenden Ausführungen brauchen daher nur in historischer Sicht besonders bedeutsame Arbeiten und die Ergebnisse einiger neuester Veröffentlichungen berücksichtigt zu werden.

Der 1953 gefundene Hemmeffekt vom Meerschweinchenserum auf Ratten- und Mäuselymphome (KIDD et al.) konnte auf dessen seit 1922 (CLEMENTI) bekannten, relativen hohen Gehalt an L-A zurückgeführt werden (BROOME 1961). Das Enzym wird aus E.coli isoliert (MASHBURN et al. 1964), ist aber auch in anderen Bakterien reichlich zu finden (RAMADAN et al.; ROWLEY et al.). L-A (L-Asparagin- Amidohydrolase) katalysiert den Abbau der essentiellen Aminosäure Asparagin zu Asparaginsäure, die ein Zwischenglied vieler anderer metabolischer Wege ist, und aus der Asparaginsynthetase in Gegenwart von ATP und Mg-Ionen wiederum durch Umamidierung der Amidgruppe des L-Glutamins Asparagin aufbaut. Schon durch einen relativ niedrigen Serum-L-A-Spiegel wird der Asparagin-gehalt des Blutes auf Null gehalten (MILLER et al.). Unter L-A wird in asparaginaseresistenten Zellen die Aktivität der Asparaginsynthetase auf das 20fache der Norm gesteigert (PRAGER et al.). Asparaginasesensible Zellen bevorzugen exogenes Asparagin und verfügen nicht über hinreichende Mengen an Asparaginsynthetase; auf diesem Doppelfekt des Asparaginstoffwechsels mancher Zellen beruht die Hemmwirkung der L-A.

L-A ist wirksam bei vielen Mäuseleukämien (BOYSE et al.), beim primären Lymphosarkom des Hundes (OLD et al.), bei einigen soliden Tumoren der Ratte (ALINIS et al.);

JAMESON et al.); bei HeLa-Zellen (KIM et al.) und in der Humanklinik im wesentlichen bei Lymphoblastenleukämien, gelegentlich bei akuten Schüben anderer Leukämien. Da bei Nieren- und Prostatakarzinomzellen keine Asparaginsynthetase gefunden werden konnte (PRAGER et al. 1969), wird mancherorts damit gerechnet, daß sich noch weitere Palliativindikationen für L-A finden lassen.

Die Nebeneffekte der Medikation von L-A sind zum Teil allergische und auf Verunreinigungen der Präparationen mit Endotoxinen beruhende Phänomene. Die gewöhnlichen pathologischen Veränderungen der Leberfunktionswerte unter L-A sollten damit zusammenhängen, daß die Asparaginsynthetaseaktivität in den Leberzellen besonders niedrig ist (HOROWITZ et al.). Vielfältige Störungen des Blutgerinnungssystems wie Hypalbuminämie sind die wesentlichen Folgen der Beeinträchtigung der hepatischen Albuminsynthese (HEIN et al.; SCHMIDT; STERN). Die Halbwertszeiten hepatischer Gerinnungsfaktoren sind entsprechend kurz, und es ist nachgewiesen (BETTIGOLE et al.), daß die Hypofibrinogenämie unter L-A nicht durch erhöhten Verbrauch, sondern durch verminderte Bildung bedingt ist. Anfangs wurde klinisch angenommen, daß L-A die normale Hämatopoese nicht beeinträchtigt. Jedoch steht experimentell fest, daß normale Lymphozyten nur graduell weniger geschädigt werden als leukämische (SCHREK et al.). GERHARTZ und BEGEMANN beschreiben bei ihren 109 mit L-A behandelten Fällen 43 sekundäre Leukopenien unter 2000 und 31 sekundäre Anämien unter 7 g% Hb. L-A löst zentralnervöse Störungen aus, bewirkt Hypcholesterinämie, Hypolipämie und hepatische Lipoidose. GERHARTZ und BEGEMANN kommen unlängst zu der Feststellung, das Enzym bewirke doch eine allgemeine und relativ unspezifische Retardierung des Zellstoffwechsels. L-A wirkt auch immunsuppressiv (SCHMÄHL;

SCHULTEN et al.; SCHWARTZ). Desgleichen sind teratogene Effekte beobachtet worden (ADAMSON et al.).

Uns stand L-A als CRASNITIN^R der Farbenfabriken Bayer AG zur Verfügung.

II. B. Aktinomyzin C

Als mit L-A zu kombinierendes zytostatisches Antibiotikum verwendeten wir Aktinomyzin C (AMC). Die Substanz wurde 1949 aus Streptomyces-Nährlösung isoliert (BROCKMANN et al.). Sie ist ein Gemisch aus C1, C2 und C3 (BROCKMANN et al. 1952), wovon letztere mit Aktinomyzin D identisch ist (BULLOCK et al.). Der zytostatische Wirkungsmechanismus der Aktinomyzine beruht auf einer Komplexbildung mit Desoxyguanosin hauptsächlich der nativen, nicht mit Histonen abgedeckten doppelsträngigen DNS, wodurch deren Matritzenfunktionen beeinträchtigt und damit die Synthese der DNS-abhängigen RNS blockiert, die DNS-Synthese dagegen vergleichsweise nur wenig beeinflusst werden (HARBERS; KERSTEN; SLOTNICK). Uns stand AMC als SANAMYCIN^R der Farbenfabriken Bayer AG zur Verfügung.

II. C. 5-Fluorurazil

Als Antimetaboliten verwendeten wir das Halogenpyrimidin 5-Fluorurazil (5-FU) der Firma Hoffmann-LaRoche AG. Die Substanz wurde 1957 erstmals synthetisiert (DUSCHINSKY et al.). Aus dem gleichen Jahr stammen die ersten Laboratoriumsberichte über Tumorchemmung und Toxizität (HEIDELBERGER). In der Monographie von PLATTNER ist alles klinisch Wissenswerte über 5-FU zusammengestellt.

Die Antimetaboliten entfalten ihre zytostatische Wirkung durch kompetitiven Stoffwechselantagonismus. Es kommt zur Bildung biochemisch inaktiver Enzym-Substrat-Komplexe, die entsprechende Stoffwechselstörungen und konsekutiv den Untergang von Tumorzellen zur Folge haben. Tumorzellen haben im allgemeinen eine geringere Fermentaktivität als normale Zellen; die gleiche Konzentration eines Antimetaboliten schädigt daher neoplastische Zellen eher, weil ihnen gegenüber seine relative Konzentration höher ist (SHAPIRO).

II. D. Antimitotika

Die von uns verwendeten Antimitotika waren Podophyllinsäureäthylhydrazid (PSH) als PRORESID^R der Firma Sandoz AG und Vinblastinsulfat (VBS) als VELBE^R der Firma Eli Lilly GmbH. Morphologisch steht bei Anwendung

der Antimitotika deren stathmokinnetischer Effekt ganz im Vordergrund, für dessen Zustandekommen eine Störung der intermolekularen Verknüpfung der praeformierten Untereinheiten der Spindelfaserstruktur verantwortlich ist.

Auf die schon seit 1861 (BENTLEY) bekannte wachstums-hemmende Wirkung von Podophyllin aus Podophyllum emodi, einer Berberidaceen-Art, hat 1942 KAPLAN erneut aufmerksam gemacht. HARTWELL wie SCHRECKER wie auch RUTSCHMANN erwarben sich Verdienste um die Strukturaufklärung des partialsynthetischen PSH. Experimentelle und klinische Erfahrungen mit PSH finden sich in der Monographie von LETTRE und WITTE.

VBS (=Vincaleukolastin) ist ein dimeres Alkaloid bekannter Struktur aus der Immergrünart Vinca rosea Linn (BEER; NEUSS et al.; NOBLE et al.). Die Monographie von GMACHL berichtet die einschlägigen experimentellen und klinischen Fakten.

II. E. Zyklophosphamid

Als Alkylans kam Zyklophosphamid, das ENDOXAN^R der Asta-Werke AG zur Verwendung. Es ist das N, N-Bis-2-(chloräthyl)-N'-O-propylenphosphorsäureesterdiazid, ein zyklischer Phosphamidester des N-Oxydlosts (ARNOLD et al.), und dürfte in Deutschland das bei weitem meistgebrauchte Zytostatikum sein. Die Substanz selbst in in vitro zytostatisch inaktiv, geht erst an den Lebermikrosomen in ein aktives Produkt über (BROCK et al.). Der Hersteller orientiert in den seit 1961 jährlich erscheinenden Endoxan-Sammelreferaten über die diesbezügliche Literatur; bislang konnten 1573 experimentelle und klinische Referate gegeben werden. Alkylierung macht lebenswichtige Zellbausteine funktionsuntüchtig und schädigt so Proliferationsgewebe vordergründig.

III. Versuchsanordnung

A. Allgemeines

1. Tiermaterial *)

Für die Versuche wurden NMRI-Albinomäuse, ein Gruppeninzuchtstamm der Tierzuchtanstalt in Ivanovas, Kießlegg, verwandt. Die Tiere, die bei ihrer Ankunft etwa 18 - 20 g wogen, wurden einige Tage bis zu dem speziellen Teil angegebenen Gewicht gehalten. Sie wurden mit Karbolfuchsin gekennzeichnet. Gruppen von 15 Tieren wurden in Makrolon-Standard-Käfigen mit einer Einstreu aus Hobelspänen gehalten. Die Mäuse bekamen ssniff-Trockenfutter M 15 (Futtermühle Plange, Soest) und 0,005 %iges Chloramin-Wasser ad libidum von den Käfigdeckeln aus Zinkdraht her. Die Käfige wurden zweimal wöchentlich in 1 %iger Trichlorol-Lösung gewaschen. Die Trinkflaschen aus Glas wurden täglich sterilisiert, ihre Gummistopfen täglich 30 min mit Hostapon-Zusatz gekocht. Pinzetten, Gummihandschuhe etc. wurden mit 0,5 % Zephirollösung behandelt. Die Hände wurden vor und nach jedem Hantieren mit den Mäusen mit Tego gewaschen. Die Lufttemperatur im Tierstall wurde durch thermostatische Kontrolle auf 22 - 25° gehalten.

2. Dosierung und Applikation der Zytostatika

Die Zytostatika AMC, 5-FU, PSH, VBS und ZPA wurden, wie sich in unserer Arbeitsgruppe bewährt hat, äquitoxisch in therapeutischen Einheiten (TE) (DRUCKREY et al.) dosiert. 1 TE = 1 % der LD_{50/30}. Diese Letaldosen bemessen sich für Mäuse bei intraperitonealer Anwendung nach Angaben der Herstellerwerke, die früher in unserer Arbeitsgruppe ausreichend überprüft wurden, auf:

AMC 750 gamma/kg, 5-FU 188 mg/kg, PSH 280 mg/kg, VBS 3,2 mg/kg und ZPA 300 mg/kg.

Die Dosierung der L-A sollte ursprünglich auch in TE vorgenommen werden, um eine quantitative Vergleichsmöglichkeit mit anderen Zytostatika zu schaffen. Die DL₅₀

*) Unsere Versuchstiere fanden im Tierstall der Abteilung für Experimentelle Radiologie der Klinik Aufnahme. Deren Leiter, Herr Prof. Dr. L. RAUSCH, hat die geschilderten Regeln eingeführt.

liegt bei L-A jedoch so hoch, daß es dem Hersteller wie uns aus finanziellen Gründen nicht möglich war, sie zu bestimmen. Wir nahmen deshalb die Dosierung in Internationalen Einheiten (IU) vor, wobei gilt: 1 IU entspricht der Menge Enzym, die in 1 min 1 Mol NH_3 bei 37° C und optimalem pH freisetzt.

Die für das einzelne Tier nach dessen Körpergewicht versuchstäglich notwendige Menge jeder Substanz wurde nach Verdünnungskurven jeweils auf 0,1 ml Ringer-Lösung gebracht und aus Tuberkulinspritzen mit Intrakutannadeln intraperitoneal injiziert. Die Medikationen wurden stets in der Zeit zwischen 14 und 18 Uhr vorgenommen, wobei L-A stets 60 Minuten vor den anderen Zytostatika gegeben wurde. Tiere, die kein L-A bzw. keine anderen Zytostatika erhielten, bekamen statt dessen 0,1 ml reine Ringer-Lösung, Kontrolltiere diese zweimal, so daß alle Versuchstiere tunlichst unter die gleichen mechanischen Streßbedingungen gesetzt wurden.

III. A. 3. Das Ohrstanzlochmodell

Mit der Beobachtung des Heilungsverlaufes von Stanzlöchern in Kaninchenohren führte HEITE ein Versuchsmodell ein, mit dem sich die schädigende Wirkungen quantitativ und vergleichend erfassen ließen. RAUSCH et al. (1962) teilten histologische Befunde über den Ausheilungsvorgang von Stanzlöchern des Kaninchenohres mit: Zunächst erschien junges Bindegewebe nach wenigen Tagen beiderseits der den Löchern benachbarten Ohrknorpel, etwas später auch an der inneren Zirkumferenz; nach zwei Wochen war die Wundkante vollständig epithalisiert und traten die ersten Zeichen der Knorpelregeneration auf; wenn das Loch sich verschloß, mußte das Epithel der Wundkante wieder auseinanderweichen. RAUSCH (1965) et al. (1966) sowie QUAIST lochten auch

Mäuseohren, konnten ähnliche Befunde wie am Kaninchenohr erheben und damit quantitativ-vergleichend arbeiten; systematische Seitendifferenzen fanden sie nicht. Unsere Arbeitsgruppe konnte früher nach radiologisch-zytostatischer Kombinationsbehandlung mit AMC, 5-FU, PSH, VBS und ZPA Verzögerungen der Abheilung von Ohrstanzwunden nachweisen, die deutlich größer waren, als die durch alleinige radiologische oder zytostatische Behandlung hervorgerufene Behinderung der Stanzlochheilung (KRATZ; RINGLEB 1967, 1968 c, 1969 a, 1970, 1971 b; SIPPEL; STECKENMESSER). BUCH zeigte mit L-A einen in diesem Test nachweisbaren geringen Hemmeffekt, der deutlicher wurde, wenn die radiogen induzierte Hemmung dazutrat.

Da die Heilungstendenz des gestanzten Ohres während des gesamten Beobachtungszeitraumes sicher nicht konstant bleibt, sondern mit der Zeit eher abnimmt, und zwar um so mehr, je länger die Heilung verzögert wird, dürfte zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin der festzustellende Effekt, d.h. die Differenzen von Prozentsätzen abgeheilter Stanzlöcher, verstärkt werden (KRATZ).

III. A. 4. Statistische Methoden

Der Vergleich zweier Prozentsätze von Ereignissen erfolgte im t-Test nach der Formel

$$t = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\frac{p_1(100-p_1)}{N_1} + \frac{p_2(100-p_2)}{N_2}}}, \quad *)$$

*) Die Berechnungen erfolgten auf einem Kleincomputer (Programma der Fa. OLIVETTI), für dessen entsprechende Programmierung wir Herrn Dipl.-Physiker K. RÖDEL zu Dank verbunden sind.

wobei p_1 und p_2 = Prozentsätze, N_1 und N_2 = Anzahl der Meßwerte. Für die Berechnung von Varianzen um einen Mittelwert von Meßwerten galt

$$s^2 = \frac{S(x_i)^2 - \frac{(S x_i)^2}{N}}{N - 1}, \quad *)$$

wobei N = Anzahl der Meßwerte, x_i = Einzelmeßwert. Der Vergleich zweier Mittelwerte im t -Test erfolgte nach

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}, \quad *)$$

wobei $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ = zu vergleichende Mittelwerte, s_1^2 und s_2^2 = zugehörige Varianzen, N_1 und N_2 = Anzahl der Versuche. Die Wahrscheinlichkeiten P ergaben sich nach $N_1 + N_2 - 2$ Freiheitsgraden aus einer STUDENT-Tafel.

a b e Aus dem Inhalt von Vierfeldertafeln wurde
c d f der chi-Quadrat-Test durchgeführt. a und
g h i b = Ereigniszahl in den beiden Klassen der
ersten, c und d = der zweiten Probe. e =
a+b. f = c+d. g = a+c. h = b+d. i = e+f =
g+h. Die Erwartungswerte A, B, C und D zu
a, b, c und d errechnen sich wie folgt: A = (e·g):i;
B = e-A; C = g-A; D = f+A-g. Dann ist

$$\chi^2 = \frac{(a-A-0,5)^2}{A} + \frac{(b-B-0,5)^2}{B} + \frac{(c-C-0,5)^2}{C} + \frac{(d-D-0,5)^2}{D},$$

wobei 0,5 die Kontinuitätskorrektur. Erwartungswerte unter 5 dürfen nicht auftreten. Die Wahrscheinlichkeit P ist unter 1 Freiheitsgrad nachzuschlagen.

III. B. Spezielle Versuchsdurchführung

Die aus einem Drahtkäfig herausragenden Ohren weiblicher Mäuse von 25 bis 28 g Körpergewicht wurden in ihrer Mitte unter Vermeidung des Anstechens großer Gefäße mit

*)
siehe Fußnote der Vorseite!

einer Silberstahlstanze von 0,5 mm $\emptyset$ gegen eine Holzunterlage gelocht.

Innerhalb der nächsten Stunde erfolgte die erste i.p.-Applikation, die dann noch 14 x im 24-Stunden-Rhythmus wiederholt wurde, so daß innerhalb von 15 Tagen 15 mal AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA allein oder in Kombination mit L-A oder letzteres allein gegeben wurden. Von AMC, 5-FU, PSH, VBS und ZPA wurde jeweils mit 8 TE, in 15 Tagen mit 120 TE behandelt, was sich früher in unserer Arbeitsgruppe als durchführbar erwiesen hatte (KRATZ; RINGLEB 1967, 1968 c, 1969 a, 1970, 1971 b; SIPPEL; STECKENMESSER), von L-A jeweils versuchstäglich 800 IU/kg = 12000 IU/kg in 15 Tagen, womit wir uns diesbezüglich im Bereich des experimentell und klinisch üblichen befanden.

Die Versuchstiere wurden vor der Stanzung und 9, 19, 29 und 49 Tage später gewogen. Bis zum 45. Tag wurden in Abständen von 48 Stunden die Ohrbefunde protokolliert. Dabei wurden die Befunde wie folgt unterzeichnet:

O = Das Stanzloch ist größer als ursprünglich.

I = Das Stanzloch hat seine ursprüngliche Größe.

II = Das Stanzloch ist deutlich kleiner.

III = Das Stanzloch ist geschlossen.

Zur Beurteilung der Stanzlochgröße wurde das Ohr mit bloßem Auge gegen durchfallendes Tageslicht angesehen. Ein Stanzloch wurde als geschlossen betrachtet, wenn an der Stanzstelle kein Licht mehr durchfiel.

Vom September bis Dezember 1970 wurden insgesamt 545 Tiere verarbeitet. Ihr mittleres Körpergewicht betrug 27,06 g, wobei die einzelnen Gruppen Abweichungen von diesem Wert von + 2,7 % bis - 3,6 % zeigten (Tabelle 1). Es wurde somit von befriedigend einheitlichen Körpergewichten ausgegangen.

IV. Ergebnisse

A. Absterberaten (Tabellen 1-3; Abbildung 1)

Von den 545 Mäusen verstarben 15 in dichtem zeitlichen Anschluß an eine Injektion, und zwar mit Haemato-peritoneum oder Haemato-retroperitoneum (Tabelle 1). Die übrige Mortalität ist auf medikamentöse Einwirkung zurückzuführen. Tabelle 2 macht deutlich, daß zwischen den 12 verschiedenen Gruppen große Differenzen in den pharmakabedingten Absterberaten bestehen. Bei Behandlung nur mit einem Zytostatikum scheint die Mortalität nur nach 15 x 8 TE VBS beachtlich, bei mit L-A kombinierter Behandlung auch bei 5-FU und PSH. Tabelle 3 zeigt, daß sich die genannten Differenzen im t-Test gegenüber den Kontrollen deutlich sichern ließen. Gegenüber alleiniger L-A Behandlung wird die Absterberate nur bei kombinierter Behandlung mit PHS und VBS größer. Die kombinierte Behandlung führt nur mit 5-FU und PSH zu höherer Mortalität als mit diesen Substanzen alleine. Es fällt auf, daß bei der angewandten Art aequitoxischer Dosierung AMC und ZPA weder alleine noch in Kombination mit L-A die Absterberate anheben, wohl aber die anderen drei Substanzen in Kombination, VBS auch alleine. Die erhaltenen Absterberaten stimmen gut überein mit den in unserer Arbeitsgruppe früher von STECKENMESSER (5-FU, PSH, ZPA) unter ähnlichen Versuchsbedingungen mitgeteilten, weniger gut mit den Zahlen von KRATZ (AMC) und SIPPEL (VBS).

Fazit: Wie Abbildung 1 zeigt, kommt es nach innerhalb von 15 Tagen in gleichen täglichen Einzelportionen applizierten 120 TE AMC, 5-FU, PSH oder ZPA weder 5 Tage nach Abschluß der Medikation noch einen Monat später zu pharmakabedingten Absterberaten, wohl aber nach VBS. 12000 IU/kg L-A im gleichen Rhythmus appliziert, bedingen geringe Absterberaten zu beiden Zeitpunkten, die nach

Tabelle 1: Tierzahl (N) und mittlere Körpergewichte (p) der Versuchsgruppen nach Behandlung mit 15 x 8 TE Aktinomyzin C (AMC), 5-Fluoruracil (5-FU), Podophyllinsäurehydrazid (PSH), Vinblastinsulfat (VBS) und Zyklophosphamid (ZPA) allein oder in Kombination mit 15 x 800 IU/kg L-Asparaginase innerhalb von 15 Tagen intraperitoneal. 1. Tag = Tag der Stanzung und ersten Medikation

Gruppen	1. Tag N	Tag p(g)	Abweichung vom Gesamt- mittel des p in (%)	Exitus durch Fehl- injekt. N	Danach N	20. Tag N	Tag p(g)	30. Tag N	Tag p(g)	50. Tag N	Tag p(g)
Kontrollen	50	26,59	- 1,7	2	48	48	29,54	48	31,46	48	34,14
L-A	45	26,90	- 0,6	1	44	42	27,75	42	31,85	42	33,95
AMC	45	27,71	+ 2,4	0	45	45	26,10	45	31,00	45	32,62
AMC + L-A	45	27,48	+ 1,6	1	44	42	22,92	42	29,80	42	33,59
5-FU	45	26,09	- 3,6	1	44	44	28,97	44	31,88	44	33,96
5-FU + L-A	45	27,66	+ 2,2	2	43	36	27,91	36	31,43	36	34,04
PSH	45	26,78	- 1,0	1	44	44	30,44	44	32,35	44	33,94
PSH + L-A	45	27,76	+ 2,6	2	43	37	28,27	37	31,07	35	34,15
VBS	45	27,52	+ 1,7	2	43	40	27,84	36	30,50	36	33,44
VBS + L-A	45	27,80	+ 2,7	2	43	37	25,78	34	30,05	30	33,60
ZPA	45	26,44	- 2,3	0	45	45	28,41	45	30,61	45	33,10
ZPA + L-A	45	26,09	- 3,6	1	44	42	26,39	42	30,39	42	31,65
Zus.	545	27,06		15	530						

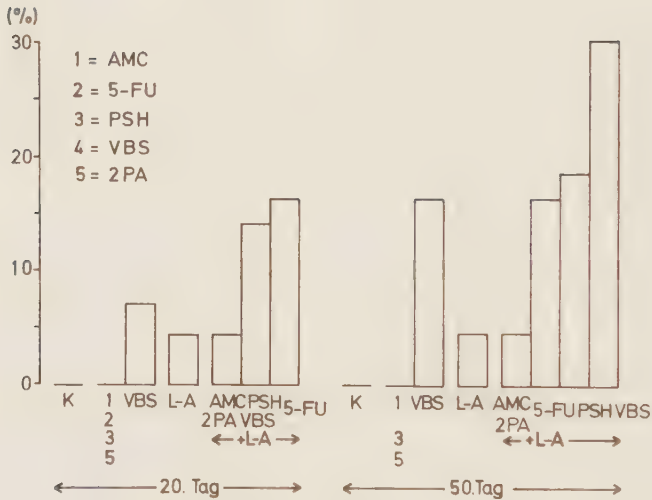
Tabelle 2: Absolute (links) und relative (rechts) Zahl der in den Versuchsgruppen der Tabelle 1 verwendeten Tiere, die nicht durch Fehl-injektion ad exitum kamen

Gruppen	Ausgangswert post inject.		Weitere Exitus bis 20. Tag		bis 30. Tag		bis 50. Tag		bis 20. Tag		bis 30. Tag		bis 50. Tag	
	N		N		N		N		%		%		%	
Kontrollen	48		0		0		0		0		0		0	
L-A	44		2		2		2		4,5		4,5		4,5	
AMC	45		0		0		0		0		0		0	
AMC + L-A	44		2		2		2		4,5		4,5		4,5	
5-FU	44		0		0		0		0		0		0	
5-FU + L-A	43		7		7		7		16,3		16,3		16,3	
PSH	44		0		0		0		0		0		0	
PSH + L-A	43		6		6		8		14,0		14,0		18,6	
VBS	43		3		7		7		7,0		16,3		16,3	
VBS + L-A	43		6		9		13		14,0		20,9		30,2	
ZPA	45		0		0		0		0		0		0	
ZPA + L-A	44		2		2		2		4,5		4,5		4,5	

Tabelle 3: Wahrscheinlichkeiten P der Differenzen der Absterberaten der Tabelle 2 nach dem t-Test

Grund- gruppe	Vergleichsgruppen	Tage	Differ. in %	t-Wert der Differenz	P kleiner als
Kontr.	L-A	20-50	4,5	1,3931	0,2
	AMC, 5-FU, PSH, ZPA	20-50	0	--	--
	VBS	20	7,0	1,7612	0,1
	VBS	30+50	16,3	2,8666	0,01
	AMC/ZPA + L-A	20-50	4,5	1,3931	0,2
	5-FU + L-A	20-50	16,3	2,8666	0,01
	PSH + L-A	20+30	14,0	2,6171	0,02
	PSH + L-A	50	18,6	3,1085	0,01
	VBS + L-A	20	14,0	2,6171	0,02
	VBS + L-A	30	20,9	3,3455	0,01
	VBS + L-A	50	30,2	4,2899	0,01
L-A	AMC/ZPA + L-A	20-50	0	--	--
	5-FU + L-A	20-50	11,8	1,8318	0,1
	PSH + L-A	20+30	9,5	1,5458	0,2
	PHS + L-A	50	14,1	2,1024	0,05
	VBS + L-A	20	9,5	1,5458	0,2
	VBS + L-A	30	16,4	2,3619	0,02
	VBS + L-A	50	25,7	3,3518	0,01
AMC	AMC + L-A	20-50	4,5	1,3921	0,2
5-FU	5-FU + L-A	20-50	16,3	2,8658	0,01
PSH	PSH + L-A	20+30	14,0	2,6162	0,02
	PSH + L-A	50	18,6	3,1077	0,01
VBS	VBS + L-A	20	7,0	1,0657	0,3
	VBS + L-A	30	4,6	0,5491	0,6
	VBS + L-A	50	13,9	1,5468	0,2
ZPA	ZPA + L-A	20-50	4,5	1,3921	0,2

Kombination mit AMC oder ZPA nicht ansteigen, dies jedoch nach Kombination mit 5-FU, PSH oder VBS schon zum früheren Zeitpunkt beachtlich, wobei sich die Raten bei VBS + L-A zwischen diesem und dem späteren Zeitpunkt beachtlich unterscheiden.



①

Abbildung 1

Abbildung 1: Graphische Darstellung des Inhalts der Tabelle 2. Medikamentös bedingte Absterberaten nach 15 x 8 TE AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA allein und in Kombination mit 15 x 800 IU/kg L-A sowie letzterem alleine innerhalb von 15 Tagen bis zum 20. und 50. Versuchstag.

IV. B. Körpergewichtszuwächse (Tabellen 1, 4-9;
Abbildung 2)

Tabelle 1 gibt auch Aufschluß über die mittleren Körpergewichte der 12 Versuchsgruppen an drei der späteren Wiegetage. In Tabelle 4 sind die mittleren Körpergewichtszuwächse der Gruppen errechnet und in Beziehung gebracht zum mittleren Ausgangsgewicht der Gruppe und zum mittleren Ausgangsgewicht der Kontrollen. Tabelle 5 wiederholt einen Teil der Tabelle 1, nur daß nur noch von den Tieren ausgehend die mittleren Körpergewichte in den Versuchsgruppen berechnet sind, die den 50. Versuchstag erlebt haben; daraus entspricht Tabelle 6 der Tabelle 4. Die Inhalte der Tabellen 1 und 4 einer-, 5 und 6 andererseits unterscheiden sich nicht wesentlich. Es sind also aus dem Ausgangsmaterial nicht etwa Tiere einer bestimmten Gewichtsklasse bevorzugt verwendet, was dafür spricht, daß es tatsächlich gelungen ist, die Medikamente nach dem Gewicht jedes einzelnen Tieres richtig zu dosieren. Es fällt in Tabelle 6 auf, daß unter der Injektionsbehandlung mit AMC im Gegensatz zu den andern allein gegebenen Substanzen eine deutliche Körpergewichtsabnahme zu verzeichnen war, und daß VBS und L-A zu einer weitaus geringeren Gewichtszunahme führten, als die Kontrollen sie aufweisen. Dasselbe gilt von allen fünf Gruppen mit kombinierter Behandlung. Von diesen verhalten sich nur die Gruppen AMC + L-A und VBS + L-A am 20. Tag auffällig schlechter als Gruppe L-A; die Gruppen AMC, 5-FU, PSH, VBS und ZPA weisen sämtlich ein günstigeres Gewichtsverhalten in der Zeit direkt nach Abschluß der Injektionsbehandlung auf, als die gleichen Gruppen mit L-A. Einen Monat später, am 50. Beobachtungstag, ist der gewichtsansatzhemmende L-A-Einfluß wieder weitgehend wettgemacht. Nur die Gruppen AMC, VBS, AMC + L-A, VBS + L-A und auch noch ZPA + L-A fallen gegenüber den Kontrollen als hoch

Tabelle 4: Mittlere Körpergewichtszuwächse in den Versuchsgruppen der Tabelle 1 unter Zugrundelegung der mittleren Körpergewichte der an den Versuchstagen noch lebenden Tiere, ab-
solut wie relativ zum mittleren Ausgangsgewicht der Gruppe (s. Tab. 1) sowie zum
mittleren Gewichtszuwachs der Kontrollen an den Versuchstagen

Gruppe	Mittlere Körpergewichtszuwächse			in % des mittleren Gewichts-			in % des mittleren Gewichts-		
	in (g) bis zum	20. Tag	30. Tag	50. Tag	Tag	20. Tag	30. Tag	50. Tag	in % des mittleren Gewichts- zuwachses der Kontrollen (= 100 %) bis zum
	20. Tag	30. Tag	50. Tag	20. Tag	30. Tag	50. Tag	20. Tag	30. Tag	50. Tag
Kontrollen	2,59	4,87	7,55	9,7	18,3	28,4	100	100	100
L-A	0,85	4,95	7,05	3,2	18,4	26,2	32,8	101,6	94,3
AMC	-1,61	3,29	4,91	-5,8	11,9	17,7	-62,1	67,6	65,0
AMC + L-A	-4,56	2,32	6,11	-16,6	8,4	22,2	-176,1	47,6	80,9
5-FU	2,88	5,79	7,87	11,0	22,2	30,2	111,2	118,9	104,2
5-FU + L-A	0,25	3,77	6,38	0,9	13,6	23,1	9,6	77,4	84,5
PSH	3,66	5,57	7,16	13,7	20,8	26,7	141,3	114,4	94,8
PSH + L-A	0,51	3,31	6,39	1,8	11,9	23,0	19,7	68,0	84,6
VBS	0,32	2,98	5,92	1,2	10,8	21,5	12,4	61,2	78,4
VBS + L-A	-2,02	2,25	5,80	-7,3	8,1	20,9	-78,0	46,2	76,8
ZPA	1,97	4,17	6,66	7,5	15,8	25,2	76,1	85,6	88,2
ZPA + L-A	0,30	4,30	5,56	1,2	16,5	21,3	11,6	88,3	73,6

Tabelle 5: Mittlere Körpergewichte (p) in den Versuchsgruppen der Tabelle 1, wenn nur die Tiere berechnet werden, die den 50. Versuchstag erlebt haben

Gruppe	N	p (g) 1. Tag	20. Tag	30. Tag	50. Tag
Kontrollen	48	26,63	29,54	31,46	34,14
I-A	42	26,88	27,75	31,85	33,95
AMC	45	27,71	26,10	31,00	32,62
AMC + I-A	42	27,63	22,92	29,80	33,59
5-FU	44	26,10	28,97	31,88	33,96
5-FU + I-A	36	27,00	27,91	31,43	34,04
PSH	44	26,80	30,44	32,35	33,94
PSH + I-A	35	27,49	28,18	30,99	34,15
VBS	36	27,40	27,89	30,36	33,44
VBS + I-A	30	27,93	25,77	30,05	33,60
ZFA	45	26,44	28,41	30,61	33,10
ZFA + I-A	42	26,10	26,39	30,39	31,65
Zus.	489	26,97			

Tabelle 6: Mittlere Körpergewichtszuwächse in den Versuchsgruppen der Tabelle 1 unter Zugrundelegung der mittleren Körpergewichte nur der Tiere, die den 50. Versuchstag erlebt haben. Absolut wie relativ zum mittleren Ausgangsgewicht der Gruppe sowie zum mittleren Gewichtszuwachs der Kontrollen an den Versuchstagen

Gruppen	in (g) bis zum			Mittlere Körpergewichtszuwächse			in % des mittleren Gewichtszuwachses		
	20.Tag	30.Tag	50.Tag	20.Tag	30.Tag	50.Tag	20.Tag	30.Tag	50.Tag
Kontrollen	2,91	4,83	7,51	10,9	18,1	28,2	100	100	100
L-A	0,87	4,97	7,07	3,2	18,5	26,3	29,9	102,9	94,1
AMC	-1,61	3,29	4,91	-5,8	11,9	17,7	-55,3	68,1	65,4
AMC + L-A	-4,71	2,17	5,96	-17,0	7,9	21,6	-161,9	44,9	79,4
5-FU	2,87	5,78	7,86	11,0	22,1	30,1	98,6	119,7	104,7
5-FU + L-A	0,91	4,43	7,04	3,4	16,4	26,1	31,3	91,7	93,7
PSH	3,64	5,55	7,14	13,6	20,7	25,6	125,0	114,9	95,1
PSH + L-A	0,69	3,50	6,66	2,5	12,7	24,2	23,7	72,5	88,7
VBS	0,49	2,96	6,04	1,8	10,8	22,0	16,8	61,3	80,4
VBS + L-A	-2,16	2,12	5,67	-7,7	7,6	20,3	-74,2	43,9	75,5
ZPA	1,97	4,17	6,66	7,5	15,8	25,2	67,9	86,3	88,7
ZPA + L-A	0,29	4,29	5,55	1,1	16,4	21,3	10,0	88,8	73,9

Tabelle 7: Mittlere Körpergewichtszuwächse in den kombiniert behandelten Versuchsgruppen der Tabelle 1 relativ zum mittleren Gewichtszuwachs der nur mit L-Asparaginase behandelten Gruppe, unter Zugrundelegung der an den Versuchstagen noch lebenden Tiere (s. Tab. 3), rechts nur der Tiere, die den 50. Versuchstag erlebt haben (s. Tab. 5)

Gruppen	Mittlere Körpergewichtszuwächse in % des mittleren Zuwachses der L-A-Gruppe (= 100 %)					
	Basis: Am Versuchstag lebende Tiere			Basis: Tiere, die den 50. Versuchstag erlebt haben		
	Bis zum 20.Tag	30.Tag	50.Tag	Bis zum 20.Tag	30.Tag	50.Tag
L-A	100	100	100	100	100	100
AMC + L-A	-536,5	46,9	86,7	-541,4	43,7	84,3
5-FU + L-A	29,4	76,2	90,5	104,6	89,1	99,6
PSH + L-A	60,0	66,9	90,6	79,3	70,4	94,2
VBS + L-A	-237,6	45,5	82,3	-248,3	42,7	80,2
ZPA + L-A	35,5	86,9	78,9	33,3	86,3	78,5

Tabelle 8: Standardabweichungen s der mittleren absoluten Körpergewichtszuwächse der Tabelle 6

Gruppe	N	Mittlere Körpergewichtszuwächse			
		Bis zum 20. Tag (g)	s	Bis zum 50. Tag (g)	s
Kontrollen	48	2,91	2,2949	7,51	2,4912
L-A	42	0,87	2,3816	7,71	2,7951
AMC	45	-1,61	3,1870	4,91	1,4378
AMC + L-A	42	-4,71	3,7797	5,96	2,2527
5-FU	44	2,87	2,4781	7,86	1,9391
5-FU + L-A	36	0,91	2,2394	7,04	2,5309
PSH	44	3,64	1,3442	7,14	2,4150
PSH + L-A	35	0,69	1,4330	6,66	2,2349
VBS	36	0,49	1,8921	6,04	1,7917
VBS + L-A	30	-2,16	2,7096	5,67	2,1409
ZPA	45	1,97	3,1486	6,66	1,9449
ZPA + L-A	42	0,29	2,6351	5,55	2,3642

Tabelle 9: Wahrscheinlichkeiten P nach dem t-Test der Differenzen der mittleren Körpergewichtszuwächse der Tabelle 6

Grund- gruppe	Vergleichs- gruppe	Differenz in (g)	t-Wert der Differenz	P kleiner als	
<u>20. Versuchstag</u>					
Kontrollen	L-A	-2,04	4,1235		0,01
	AMC	-4,52	7,8875		0,01
	5-FU	-0,04	0,0798	1,0	
	PSH	+0,73	1,8800	0,1	
	VBS	-2,42	5,2915		0,01
	ZPA	-0,94	1,6363	0,2	
	AMC + L-A	-7,62	11,361		0,01
	5-FU + L-A	-2,00	4,0079		0,01
	PSH + L-A	-2,22	5,4100		0,01
	VBS + L-A	-5,07	8,5160		0,01
L-A	ZPA + L-A	-2,62	4,9958		0,01
	AMC + L-A	-5,58	8,0948		0,01
	5-FU + L-A	+0,04	0,0764	1,0	
	PSH + L-A	-0,18	0,4090	0,7	
	VBS + L-A	-3,03	4,9168		0,01
AMC	ZPA + L-A	-0,58	1,0583	0,3	
	AMC + L-A	-3,10	4,1211		0,01
	5-FU + L-A	-1,96	3,7116		0,01
	PSH + L-A	-2,95	9,3414		0,01
	VBS + L-A	-2,65	4,5171		0,01
ZPA	ZPA + L-A	-1,68	2,7054		0,01
<u>50. Versuchstag</u>					
Kontrollen	L-A	+0,20	0,3562	0,8	
	AMC	-2,60	6,2113		0,01
	5-FU	+0,35	0,7553	0,5	
	PSH	-0,37	0,7231	0,5	
	VBS	-1,47	3,1451		0,01
	ZPA	-0,85	1,8403	0,1	
	AMC + L-A	-1,55	3,0993		0,01
	5-FU + L-A	-0,47	0,8464	0,4	
	PSH + L-A	-0,85	1,6299	0,2	
	VBS + L-A	-1,84	3,4645		0,01
L-A	ZPA + L-A	-1,96	3,8265		0,01
	AMC + L-A	-1,75	3,1593		0,01
	5-FU + L-A	-0,67	1,1106	0,3	
	PSH + L-A	-1,05	1,8314	0,1	
	VBS + L-A	-2,04	3,5049		0,01
AMC	ZPA + L-A	-2,16	3,8238		0,01
	AMC + L-A	+1,05	2,5713		0,02
	5-FU + L-A	-0,82	1,5978	0,2	
	PSH + L-A	-0,48	0,9149	0,4	
	VBS + L-A	-0,37	0,7522	0,5	
ZPA	ZPA + L-A	-1,11	2,3821		0,02

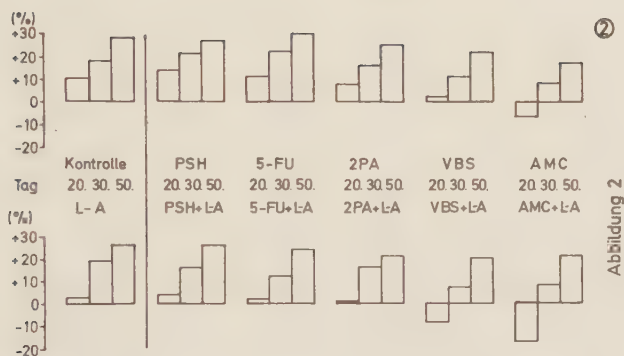


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Inhalts der Tabelle 6. Körpergewichtsveränderungen nach 15 x 8 TE AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA allein und in Kombination mit 15 x 800 IU/kg L-A sowie letzterem allein innerhalb von 15 Tagen bis zum 20. und 50. Versuchstag. Verwertet sind nur die Tiere, die den 50. Versuchstag erlebt haben. Die Gruppen sind in jeder Zeile in der Reihenfolge der Reduktion der Körpergewichtszuwächse aufgeführt. % ausgehend vom mittleren Körpergewicht jeder Gruppe am 1. Tag.

rückständig auf, so daß gesagt werden kann, daß 5-FU und PSH auf das Gewichtsverhalten der Tiere gar keinen Einfluß haben. ZPA einen mäßig mindernden, AMC, VBS und L-A einen beachtlichen, wobei sich der L-A-Effekt nach Absetzen der Therapie am schnellsten von den Tieren einholen läßt. Alle diese Schlüsse bestätigen sich statistisch gesehen aus Tabelle 9.

Unsere mit der Waage gewonnenen Ergebnisse stimmen gut überein mit den entsprechenden Ergebnissen von BUCH (L-A), KRATZ (AMC), STECKENMESSER (5-FU, PSH, ZPA), weniger mit denen von SIPPEL (VBS).

Fazit: Wie Abbildung 2 verdeutlicht, kommt es nach innerhalb von 15 Tagen in gleichen täglichen Einzelportionen applizierten 120TE BSH und 5-FU zu keinem Rückgang der Körpergewichtszuwachses 5 Tage nach Abschluß der Medikation (20. Tag) oder einen Monat später, durch ZPA nur zu einem geringen, durch VBS und AMC zu einem deutlichen. 12 000 IU/kg L-A bewirken nur zum ersteren Zeitpunkt eine Reduktion des Körpergewichtszuwachses. Werden AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA mit L-A in den genannten Dosen simultan kombiniert, ist eine Zuwachsreduktion nach 5-FU + L-A und nach PSH + L-A gegenüber L-A alleine nicht festzustellen, bei ZPA + L-A ist sie ganz gering, bei VBS + L-A und AMC + L-A bedeutend. Gegenüber reiner Behandlung mit AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA ist Kombinationsbehandlung mit L-A zum frühen Zeitpunkt bei allen fünf zytostatischen Substanzen eingreifender, zum späteren nur noch bei ZPA.

IV. C. Ohrstanzlochbefunde (Tabellen 10-14; Abbildung 3)

Tabellen 10 und 11 orientieren über die Befunde an den Ohrstanzlöchern in den 12 Versuchsgruppen in absoluten Zahlen. Es fällt auf, daß nicht doppelt so viele Ohren vorhanden sind wie in Tabelle 1 Versuchstiere. Dies erklärt sich einmal dadurch, daß mehrfach Fehlstanzen vorkamen, d.h., die Löcher zu weit am Rand der Ohren gesetzt wurden, und es dadurch zu Blutungen und Krustenbildung kam, oder gar die Ohren einrissen. Zum anderen waren die Ohren später verendeter Tiere bereits vorher beiderseits abgeheilt, so daß wir keinen Grund sahen, diese Tiere aus den Tabellen 10 und 11 zu entfernen.

Tabelle 10:

Befunde an Ohrstanzlöchern nach Behandlung mit 15 x 8 TE Aktinomyzin C (AMC), 5-Fluoruracil (5-FU), Podophyllinsäureäthylhydrazid (PSH), Vinblastinsulfat (VBS) oder Cyclophosphamid (ZPA) sowie 15 x 800 IU/kg L-Asparaginase intraperitoneal innerhalb von 15 Tagen. Kontrollen = 15 x phys. NaCl i.p.. 1. Tag = Tag des Versuchsbeginns (Stanzung, 1.i.p.-Injektion). Befunde: 0 = Ohrloch größer als nach der Stanzung; I = Ohrloch so groß wie bei der Stanzung; II = Stanzloch verkleinert; III = Stanzloch geschlossen. Absolute Zahlen

Gruppe	N	Stadium	Befunde am Versuchstag																	
			3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	35	39	43
Kontrollen	94	0	1	1	1	0														0
		I	32	10	2	1	1	0												0
		II	61	80	62	48	39	20	8	4	3	1	1	1	1	0				0
		III	0	3	30	44	54	73	86	90	91	93	93	93	94					94
L-A	83	0	1	2	0															0
		I	27	11	3	2	2	1	1	0										0
		II	55	65	65	61	53	37	25	21	16	10	9	3	2					2
		III	0	5	15	20	28	45	57	62	67	73	74	80	81					81
AMC	90	0																		0
		I	53	51	7	4	0													0
		II	37	39	83	85	65	46	44	43	40	37	28	21	18	18	15	11	10	10
		III	0	0	1	25	44	44	46	47	50	53	62	69	72	72	75	79	80	80
5-FU	88	0	12	6																0
		I	38	14	11	6	3	1	1	1	1	0								0
		II	37	64	63	46	25	18	10	7	3	3	1	0						0
		III	1	4	14	36	60	69	77	80	84	85	87	88						88
PSH	88	0																		0
		I	49	27	7	3	0													0
		II	39	61	81	69	58	49	36	10	8	2	1	1	1	1	1	1	1	0
		III	0	0	0	16	30	39	52	70	79	86	87	87	87	87	87	87	87	88
VBS	80	0	1	1	0															0
		I	35	24	5	3	0													0
		II	44	55	70	64	53	45	32	23	15	10	6	5	5	4	3	2	2	2
		III	0	0	5	13	27	35	48	57	65	70	74	75	75	75	77	78	78	78
ZPA	90	0	18	10	2	2	1	0												0
		I	72	41	34	13	5	3	0											0
		II	0	36	50	67	72	53	42	39	37	34	23	17	15	14	13	8	7	6
		III	0	0	3	4	8	12	34	48	51	53	56	67	73	75	77	82	83	84

Tabelle 11: Befunde an Ohrstanzlöffchern nach kombinierter Behandlung mit AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA einerseits und I-A andererseits. Sonst siehe Tabelle 10. Absolute Zahlen

Gruppen	N	Sta- dium	Befunde am Versuchstag																39	43
			3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	35		
AMC + I-A	84	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
		I	47	36	40	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	30	22	16	16	16
		III	36	47	43	76	74	75	69	66	60	56	44	35	32	53	61	68	68	68
5-FU + I-A	74	0	9	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		I	43	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		III	0	0	2	13	46	54	65	63	64	64	65	67	68	68	68	69	69	69
PSH + I-A	78	0	0	0	0	0	0	0	9	11	10	10	9	7	6	6	6	5	5	5
		I	48	21	9	7	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		III	30	57	69	69	64	54	53	43	35	28	24	14	7	7	6	4	2	2
VBS + I-A	74	0	2	1	0	0	0	0	23	33	42	50	54	64	71	71	72	74	76	76
		I	29	24	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		III	43	49	72	72	59	40	30	29	19	10	8	5	4	2	2	1	0	0
ZPA + I-A	84	0	17	4	5	5	4	3	1	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	2
		I	63	30	24	24	6	0	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
		III	4	49	54	51	65	55	43	42	41	36	35	30	24	21	18	14	9	9
			0	1	1	9	26	26	38	39	40	45	47	52	58	61	64	64	68	74

In der Tabelle 12 beschäftigen wir uns mit den Prozentsätzen von Stanzlöchern, die in die Gruppe 0 geraten sind, sich also gegenüber dem Stanztage vergrößert haben. Es fällt auf, daß dererlei nur bei ZPA und 5-FU vorgekommen ist, und zwar mit einer Häufigkeit, die am 3. Beobachtungstag, also 2 Tage nach der Stanzung, um 20 bzw. 10 % über der der Kontrollen und der L-A-Gruppe liegt, was sich im t-Test mit einer Irrungswahrscheinlichkeit von unter 1 % sichern läßt. Die zusätzliche L-A-Medikation erbringt keinen sicherbaren zusätzlichen Effekt.

In Tabelle 13 findet sich das Ergebnis der Erörterungen, inwieweit Stanzlöcher in den 12 Versuchsgruppen an den Nachbeobachtungstagen noch nicht kleiner geworden sind, also dem Stadium 0 oder I angehören. Es wird deutlich, daß sich bis zum Ende der 1. oder Anfang der 2. Beobachtungswoche sämtliche Zytostatika außer L-A gesichert dahin auswirken, daß mehr Stanzlöcher als bei den Kontrollen (wie auch gegenüber der L-A-Gruppe) noch nicht kleiner geworden sind, wobei ZPA den am längsten dauernden Effekt hat. Die kombiniert behandelten Gruppen weisen teils höhere, teils geringere Werte auf, von denen nur zwei höhere und zwei geringere sicherbar sind.

Die wesentlichen Befunde finden sich in Tabelle 14. Es bestehen deutliche Differenzen in Prozentsätzen schon geschlossener Ohren zwischen den Kontrollen und den einfach zytostatisch behandelten Gruppen, und zwar so, daß mit ganz wenigen Ausnahmen durchweg nach zytostatischer Behandlung weniger Ohren abgeheilt sind, und zwar statistisch sicher bei AMC und ZPA vom 7. bis zum 43. Beobachtungstag, bei L-A, PSH oder VBS vom 7. bis zum 23., 19. oder 23. Tag, bei 5-FU jedoch nur am 7. Tag. Diese

Tabelle 12: Differenzen zwischen Prozentsätzen von Stanzlöchern, die größer als am Stanztag geworden sind (Stadium 0) und Wahrscheinlichkeiten P dieser Differenzen nach dem t-Test. Gruppen der Tabellen 10 und 11

N	Versuchstag:	3	5	7	9	11	13	15-19
<u>Relativwerte zu Tabellen 10 und 11 (%)</u>								
94	Kontrollen	1,1	1,1	1,1	0,0	0	0	0
83	L-A	1,2	2,4	0	0	0	0	0
90	AMC	0	0	0	0	0	0	0
88	5-FU	13,6	6,8	0	0	0	0	0
88	PSH	0	0	0	0	0	0	0
80	VBS	1,3	1,3	0	0	0	0	0
90	ZPA	20,0	11,1	2,2	2,2	1,1	0	0
84	AMC + L-A	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
74	5-FU + L-A	12,2	8,1	1,4	0	0	0	0
78	PSH + L-A	0	0	0	0	0	0	0
74	VBS + L-A	2,7	1,4	0	0	0	0	0
84	ZPA + L-A	20,2	4,8	6,0	6,0	4,8	3,6	1,2
<u>Überschuß der vorstehenden Werte gegenüber Kontrollen</u>								
	L-A	0,1	1,3					
	5-FU	12,5	5,7					
	VBS	0,2	0,2					
	ZPA	18,9	10,0	1,1	2,2	1,1		
<u>t-Werte dazu</u>								
	L-A	0,0622	0,6517					
	5-FU	3,2851	1,9715					
	VBS	0,1204	0,1204					
	ZPA	4,3434	2,8722	0,5840	1,3290	0,8720		
<u>P, sofern höchstens</u>								
	5-FU	0,01	0,1					
	ZPA	0,01	0,01					
<u>Überschuß der obigen Werte über die der L-A-Gruppe</u>								
	AMC + L-A			1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	5-FU + L-A	11,0	5,7	1,4	0	0	0	0
	VBS + L-A	1,5						
	ZPA + L-A	19,0	2,4	6,0	6,0	4,8	3,6	1,2
<u>t-Werte dazu</u>								
	AMC + L-A			0,8888	0,8888	0,8888	0,8888	0,8888
	5-FU + L-A	2,7583	1,5882	0,9225				
	VBS + L-A	0,6727						
	ZPA + L-A	4,1843	0,8350	2,2568	2,2568	1,9932	1,6974	0,8888
<u>P, sofern höchstens</u>								
	5-FU + L-A	0,05						
	ZPA + L-A	0,01		0,05	0,05	0,05	0,1	
<u>Überschuß kombiniert mit L-A behandelter Gruppen über die entsprechende Gruppe ohne L-A:</u>								
	AMC + L-A	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	5-FU + L-A			1,4				
	VBS + L-A	1,4	0,1					
	ZPA + L-A	0,2		4,8	4,8	3,7	3,6	1,2
<u>t-Werte dazu</u>								
	AMC + L-A	0,8915	0,8915	0,8915	0,8915	0,8915	0,8915	0,8915
	5-FU + L-A			0,9241				
	VBS + L-A	0,6167	0,0537					
	ZPA + L-A	0,0329		1,2593	1,2593	1,4349	1,6993	0,8915
<u>P, sofern höchstens</u>								
	ZPA + L-A	0,1					0,1	

Tabelle 13: Differenzen zwischen Prozentsätzen von Stanzlöchern, die noch nicht kleiner als am Stanztage geworden sind (Stadium I und 0) und Wahrscheinlichkeiten P dieser Differenzen nach dem t-Test. Gruppen der Tabellen 10 und 11

N	Versuchstag:	3	5	7	9	11	13	15	17
<u>Relativwerte zu Tabellen 10 und 11 (%)</u>									
94	Kontrollen	35,1	11,7	2,2	2,1	1,1	1,1	0	0
83	L-A	33,7	15,7	3,6	2,4	2,4	1,2	1,2	0
90	AMC	58,9	56,7	7,8	4,4	0	0	0	0
88	5-FU	56,8	22,7	12,5	6,8	3,4	1,1	1,1	1,1
88	PSH	55,7	30,7	8,0	3,4	0	0	0	0
80	VBS	45,1	31,3	6,3	3,9	0	0	0	0
90	ZPA	100	57,7	40,0	16,6	6,7	3,3	0	0
84	AMC + L-A	57,1	44,0	36,9	3,6	2,4	2,4	2,4	2,4
74	5-FU + L-A	70,3	21,6	6,8	0	0	0	0	0
78	PSH + L-A	61,5	26,9	11,5	9,0	3,8	2,6	2,6	2,6
74	VBS + L-A	41,9	33,6	2,7	0	0	0	0	0
84	ZPA + L-A	95,2	50,5	34,6	34,6	11,9	3,6	3,6	3,6

Überschuß vorstehender Werte über Kontrollen

L-A		4,0	1,4	0,3	1,3	0,1	1,2		
AMC	23,8	45,0	5,5	2,3					
5-FU	21,7	11,0	10,3	4,7	2,3		1,1	1,1	
PSH	20,7	15,0	5,8	1,3					
VBS	10,1	19,6	4,1	1,8					
ZPA	64,9	56,0	37,8	14,5	4,3	2,2			

t-Werte dazu

L-A		0,7707	0,5504	0,1340	0,6517	0,0622	0,8879		
AMC	3,3284	7,2742	1,7466	0,8781					
5-FU	3,0059	1,9779	2,6848	1,5339	1,0401		0,8631	0,8631	
PSH	2,8492	3,2040	1,7771	0,5343					
VBS	1,3462	3,1850	1,3186	0,6866					
ZPA	13,133	7,4515	7,0247	3,4593	1,9673	1,0145			

P, sofern höchstens 0,1

AMC	0,01	0,01	0,1						
5-FU	0,01	0,05	0,01						
PSH	0,01	0,01	0,1						
VBS		0,01							
ZPA	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05				

Überschuß der obigen Werte über die der L-A-Gruppe

AMC + L-A	23,4	28,3	3,3	1,2		1,2	1,2	2,4	
5-FU + L-A	36,6	5,9	3,2						
PSH + L-A	27,8	11,2	7,9	6,6	1,4	1,4	1,4	2,6	
VBS + L-A	8,2	17,9	0,9						
ZPA + L-A	61,5	34,8	31,0	32,2	9,5	2,4	2,4	3,6	

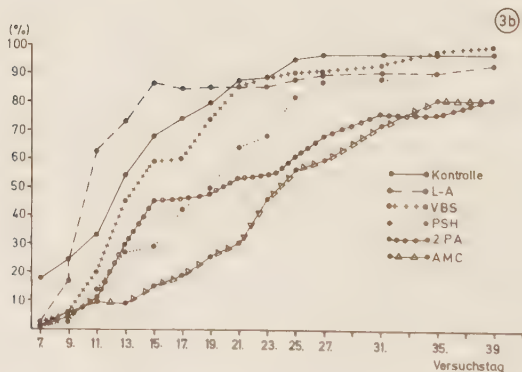
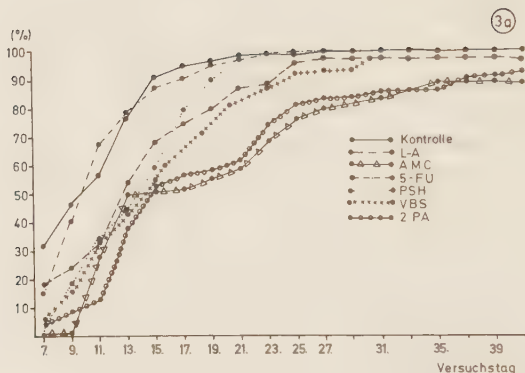
Fortsetzung von Tabelle 13

Versuchstag:	3	5	7	9	11	13	15	17
t-Werte dazu								
AMC + L-A	3,1247	4,2057	5,8959	0,4551		0,5844	0,5844	1,3485
5-FU + L-A	4,9292	0,9468	0,8963					
PSH + L-A	3,6733	1,7458	1,9032	1,8082	0,5109	0,6475	0,6475	1,3624
VBS + L-A	1,0602	2,6365	0,3237					
ZPA + L-A	8,2825	5,1475	5,5570	5,9025	2,4285	1,0178	1,0178	1,6974
P, sofern höchstens 0,1								
AMC + L-A	0,01	0,01	0,01					
5-FU + L-A	0,01							
PSH + L-A	0,01	0,1	0,1					
VBS + L-A		0,01						
ZPA + L-A	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02			
<u>Überschuß kombiniert behandelter Gruppen über entsprechende Gruppen ohne L-A:</u>								
AMC + L-A		-12,7	29,1		2,4	2,4	2,4	2,4
5-FU + L-A	13,5		-5,7	-6,8	-3,4			
PSH + L-A	5,8	-3,8	3,5	5,6	3,8	2,6	2,6	2,6
VBS + L-A	-3,2	2,3	-3,6	-3,8				
ZPA + L-A	-4,8	-7,2	-5,4	18,0	5,2	0,3	3,6	3,6
t-Werte dazu								
AMC + L-A		1,6879	4,8697	0,2696	1,3507	1,3507	1,3507	1,3507
5-FU + L-A	1,8024		1,3133	2,5589	1,7374			
PSH + L-A	0,7590	0,5470	0,7564	1,4844	1,6888	1,3638	1,3638	1,3638
VBS + L-A	0,4050	0,3046	1,0890	1,8816				
ZPA + L-A	1,9947	0,9547	0,7375	2,7669	1,1798	0,1083	1,6993	1,6993
P, sofern höchstens 0,1								
AMC + L-A		0,1	0,01					
5-FU + L-A	0,1			-0,02	-0,1		0,1	0,1
PSH + L-A					0,1			
VBS + L-A				0,1				
ZPA + L-A	-0,05			0,01			0,1	0,1

Befunde stimmen mit den Angaben von BUCH, KRATZ, SIPPEL und STECKENMESSER durchaus überein. Besonders wichtig dürfte sein, daß wir in der Lage waren, die Ergebnisse von BUCH zu reproduzieren: Sie erreichte bei alleiniger L-A-Behandlung mit 16 x 800 IU/kg im 48-Stunden-Rhythmus statistisch gesicherte Differenzen der Abheilungsraten vom 12. - 18. Tag, wir mit 15 x 800 IU/kg im 24-Stunden-Rhythmus vom 7. - 23. Tag. Auffallend ist, daß 5-FU die endgültige Stanzlochheilung schließlich am wenigsten deutlich verhindert. 5-FU allein hatte Gewichtszuwachs und Absterberate nicht beeinflußt, was allerdings von PSH und ZPA auch galt.

Die kombiniert behandelten Gruppen haben gegenüber alleiniger L-A-Behandlung weniger Stanzlochabheilungen: AMC + L-A wie ZPA + L-A vom 7. - 43. Tag gesichert, PSH + L-A vom 7. - 25. Tag, VBS + L-A nur am 7. und 9. und 5-FU + L-A nur am 7. Tag. In der letzteren Gruppe kam es sogar vom 11. - 15. Tag zu gesichert mehr Heilungen!

Vergleicht man die kombiniert behandelten mit den entsprechenden ohne L-A behandelten Gruppen, so zeigt sich nach kombinierter Behandlung bei PSH + L-A vom 9. - 31. Tag mit Irrtumswahrscheinlichkeiten unter 5 % eine Abheilungshemmung, nach AMC + L-A vom 11. - 27. Tag, nach VBS + L-A nur am 7. und 9. Tag, bei ZPA + L-A nur vom 23. - 27. Tag und nach 5-FU + L-A sowohl am 7. und 9., als auch vom 19. - 43. Tag.



Abbildungen 3 a und b: Graphische Darstellung des Inhalts der Tabelle 14. Prozentsätze geschlossener Ohrstanzlöcher im Ohrstanzlochtest an verschiedenen Tagen nach Beginn der Medikation von 15 x 8 TE AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA allein (a) und in Kombination mit 15 x 800 IU/kg L-A (b) sowie letzterem alleine.

Fazit: Damit ist erwiesen, daß es nach kombinierter Chemotherapie mit den Antimitotika PSH oder VBS, dem Antibiotikum AMC, dem Antimetaboliten 5-FU oder dem Alkylans ZPA und L-A zu einem im Ohrstanzloch nachweisbaren kumulativen Hemmeffekt auf die Wundheilung kommt. Abbildung 3a läßt erkennen, daß der Hemmeffekt alleiniger zytostatischer Behandlung bei aequitoxischer Dosierung in TE von 5-FU an zunimmt in der weiteren Reihenfolge PSH, VBS, ZPA, AMC. Bei Kombinationsbehandlung mit L-A nimmt der Kombinationseffekt in der Reihenfolge (5-FU), VBS, PSH, ZPA, AMC zu.

IV. D. Korrelation zwischen Absterberaten, Körpergewichtszuwächsen und Ohrstanzlochbefunden
(Tabellen 15-16)

Tabelle 15, in der die verwendeten Zytostatika in der Reihenfolge zunehmender Wirksamkeit bezüglich der drei Kriterien Absterberaten, Reduktion des Körpergewichtes und Hemmung der Heilung der Ohrstanzlöcher aufgeführt sind, besagt, daß bei Kombinationsbehandlung die durch die Einzelbehandlung gegebene Folge erhalten bleibt. Die Tatsache, daß der Grad der Effektivität der Einzelsubstanzen gegenüber den drei beobachteten Phaenomenen keinesfalls durchweg parallel geht, weist in erster Linie darauf hin, wie schwierig, eigentlich unmöglich es ist, Zytostatika generell aequitoxisch zu dosieren. Die TE basiert auf der LD 50/30, also auf der Absterberate bis zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Einschlagbehandlung mit hoher Dosis. Schon aus Abbildung 1 wurde deutlich, daß die Absterbekurven bei fraktionierter Behandlung sich wesentlich unterschieden, demnach der Fraktionierungsfaktor von Substanz zu Substanz ein anderer ist. Gleiche Absterbeordnungen müssen erst recht nicht zwangsläufig auch gleiches Gewichtsverhalten und gleiche Wundheilungshemmung bedeuten. Aus Tabelle 15

Tabelle 14: Differenzen zwischen den Prozentsätzen von Stanzlöffeln, die geschlossen sind (Stadium III) und Wahrscheinlichkeit dieser Differenzen nach dem t-Test. Gruppen der Tabellen 10 und 11

N	Versuchstag:	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	31	35	39	43
Relativwerte zu Tabellen 10 und 11 (%):																
94	Kontrollen	31,9	46,8	57,4	77,7	91,5	95,7	96,8	98,9	98,9	98,9	100	100	100	100	100
83	L-A	18,1	24,1	33,7	54,2	68,7	74,7	80,7	88,0	89,2	96,4	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5
90	AMC	0	1,1	27,8	48,9	51,1	52,2	55,6	58,9	68,9	76,7	80,0	83,3	87,8	88,9	88,9
88	5-FU	15,9	40,9	68,2	78,4	87,5	90,9	95,5	96,6	98,9	100	100	100	100	100	100
88	PSH	0	18,2	34,1	44,3	59,1	79,5	89,8	97,7	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9
80	VBS	6,3	16,3	33,8	43,8	60,0	71,3	81,3	87,5	92,3	93,8	93,8	96,3	97,5	97,5	97,5
90	ZPA	4,4	8,9	13,3	37,8	53,3	56,7	58,9	62,2	74,4	81,1	83,3	84,4	85,6	91,2	92,2
84	AMC + L-A	0	6,0	9,5	8,3	15,5	19,0	26,2	31,0	46,4	57,1	60,7	72,6	81,0	81,0	81,0
74	5-FU + L-A	2,7	19,6	6,2	73,0	87,8	85,1	86,5	86,5	87,8	90,5	91,9	91,9	93,2	93,2	93,2
78	PSH + L-A	0	2,6	14,1	28,2	29,5	42,3	53,8	64,1	69,2	82,1	91,0	92,3	94,8	97,4	97,4
74	VBS + L-A	0	2,7	20,3	45,9	59,4	60,8	74,3	86,5	89,2	93,2	94,6	97,3	98,6	100	100
84	ZPA + L-A	1,2	4,8	10,7	31,0	45,2	46,4	47,6	53,6	56,0	61,9	69,9	76,2	76,2	81,0	88,1

Überschluß der Kontrollen über vorstehende Werte:

L-A	13,8	22,7	23,7	23,5	22,8	21,0	16,1	10,9	9,7	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
AMC	31,9	45,7	29,6	28,8	40,4	43,5	41,2	40,0	30,0	22,2	20,0	16,7	12,2	11,1	11,1	11,1
5-FU	16,0	5,9	-10,8	-0,7	4,0	4,8	1,3	2,3	0	-1,1	0	0	0	0	0	0
PSH	31,9	28,6	23,3	33,4	32,4	16,2	7,0	1,2	0	0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
VBS	25,6	30,5	23,6	33,9	31,5	24,4	15,5	11,4	6,6	5,1	6,2	3,7	2,5	2,5	2,5	2,5
ZPA	27,5	37,9	44,1	39,9	38,2	39,0	37,9	36,7	24,5	17,8	16,7	15,6	14,4	8,8	7,8	7,8

t-Werte dazu

L-A	2,1560	3,2587	3,2575	3,3799	3,8999	4,0304	3,4278	2,9257	2,7150	1,0820	1,3781	1,3781	1,3781	1,3781	1,3781	1,3781
AMC	6,5991	8,6838	4,2584	4,2373	6,7298	7,6776	7,4328	7,5519	6,0041	4,8428	4,7057	4,2079	3,4918	3,3060	3,3060	3,3060
5-FU	2,5852	0,8032	1,5174	0,1140	0,8791	1,2931	0,4546	1,0401	0,8871	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631
PSH	6,5987	4,3411	3,2452	4,8994	5,4195	3,3855	1,8909	0,6230	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631	0,8631
VBS	4,6362	4,6222	3,2121	4,8329	5,0917	4,4580	3,2824	2,9604	2,0828	1,7337	2,2461	1,6858	1,2516	1,2516	1,2516	1,2516
ZPA	5,2171	6,3614	7,0775	5,9774	6,3488	6,9158	6,6974	7,0264	5,1858	4,1737	4,2079	4,0378	3,8491	2,8962	2,7412	2,7412

Fortsetzung von Tabelle 14

[illegible]

Fortsetzung von Tabelle 14

Versuchstags	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	31	35	39	43
Überchuß ohne I-A behandelten Gruppen über kombiniert behandelte Gruppen															
AMC + I-A	0	-4,9	18,3	40,6	35,6	33,2	29,4	27,9	22,5	19,6	13,3	8,7	6,8	7,9	
5-FU + I-A	13,2	23,3	6,0	5,4	-0,3	5,6	9,0	10,1	12,1	9,5	8,1	8,1	6,8	6,8	
FSH + I-A	0	15,6	20,0	16,1	29,6	37,2	36,0	33,6	29,7	16,8	7,9	6,6	4,1	1,5	
VBS + I-A	6,3	13,6	13,5	-2,1	0,6	10,5	13,0	1,0	3,1	0,6	-0,8	-1,0	-1,1	-2,5	
ZPA + I-A	3,2	4,1	2,6	6,8	8,1	10,3	9,3	8,6	18,4	19,8	14,3	8,2	9,4	10,2	4,1
t-Werte dazu															
AMC + I-A		1,7408	3,2082	6,6904	5,4066	4,8927	4,1393	3,8556	3,0785	2,7995	2,8402	1,7103	1,2369	1,4598	
5-FU + I-A		3,0488	3,3963	0,7988	0,7972	0,0578	0,8918	1,9799	2,2865	2,8004	2,7444	2,2744	2,5082	2,5082	
FSH + I-A		3,4740	3,1210	2,1910	4,0232	5,2708	5,5368	5,9345	5,5573	3,7494	2,3060	2,0517	1,4915	0,7085	
VBS + I-A		2,2618	2,9961	1,9124	0,2618	0,0758	1,3813	1,0457	0,1843	0,7210	0,1508	0,2125	0,3535	0,4963	
ZPA + I-A		1,2972	1,0786	0,5287	0,9467	1,0715	1,3656	1,5021	1,5893	2,8588	2,354	1,3652	1,5824	1,9544	
P, sofern höchstens 0,1															
AMC + I-A		0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,1			
5-FU + I-A		0,01	0,01				0,05	0,05	0,01	0,01	0,05	0,05	0,02	0,02	
FSH + I-A		0,01	0,01		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,05			
VBS + I-A		0,05	0,01												
ZPA + I-A									0,01	0,01	0,05				

Tabelle 16: Verteilung der abgeheilten (e) und nichtabgeheilten (f) Ohren auf diejenige Hälfte der Tiere einer Gruppe, die nach Ordnung nach dem Gewichtszuwachs bis zum 20. Versuchstag weniger (g) und mehr(h) zugenommen hatten. Es sind a = Anzahl von abgeheilten Ohren in g; b = Anzahl von abgeheilten Ohren in h; c = Anzahl von nicht abgeheilten Ohren in g; d = Anzahl von nicht abgeheilten Ohren in h. So wird eine Vierfeldertafel erstellt, aus der P im chi-Quadrat-Test errechnet wird. Untersucht wird jeweils der Tag, an dem die mittlere logarithmische Heilung eingetreten war. i = Zahl der Ohren einer Gruppe an diesem Tag.

Gruppe	Tag	Tier- zahl	a c g	b d h	e f i	chi ²	P kleiner als (1 Freiheitsgrad)
Kontrollen	11	46	24 22 46	29 17 46	53 39 92	1,1571	0,3
L-A	13	41	18 22 40	25 17 42	43 39 82	1,7859	0,2
AMC	15	45	13 31 44	33 13 46	46 44 90	16,0699	0,01
5-FU	11	44	35 9 44	25 19 44	60 28 88	5,2905	0,02
PSH	15	44	24 20 44	28 16 44	52 36 88	0,7990	0,5
VBS	15	40	14 26 40	34 6 40	48 32 80	17,3436	0,01
ZPA	15	45	19 15 44	29 17 46	48 42 90	2,6130	0,2
AMC + L-A	25	42	12 30 42	36 6 42	48 36 84	28,0485	0,01
5-FU + L-A	11	36	25 11 36	20 16 36	45 27 72	1,5405	0,3
PSH + L-A	19	37	12 24 36	29 9 38	41 33 74	13,8861	0,01
VBS + L-A	15	37	17 19 36	27 11 38	44 30 74	4,3956	0,05
ZPA + L-A	21	42	18 24 42	27 15 42	45 39 84	9,3206	0,01

(zusammen mit den Abbildungen 1 bis 3) ist denn auch ersichtlich, daß AMC bei fehlender Absterberate zu deutlichster Gewichtszuwachsverminderung und Ohrstanzlochheilungshemmung führt, 5-FU und PSH alle drei Kriterien wenig beeinflussen, VBS Absterberate und Gewichtsverhalten deutlich, die Wundheilungsgeschwindigkeit weniger beeinflußt, ZPA die Absterberate nicht, das Körpergewicht wenig, die Stanzlochheilung deutlich. L-A nimmt in allen Zeilen der Tabelle 15 eine Mittelstellung ein.

Inwieweit eine Korrelation zwischen Reduktion des Körpergewichtszuwachses und der Hemmung der Stanzlochheilung statistisch behauptet werden kann, wird in Tabelle 16 im chi-Quadrat-Test nach Aufstellung einer Vierfeldertafel für jede Versuchsgruppe untersucht. Dazu wurden die Tiere einer Gruppe nach ihrem Körpergewichtszuwachs bis zum 20. Versuchstag geordnet und dann die Liste halbiert in solche mit dem geringen Zuwachs (resp. größerem Körpergewichtsverlust) und die mit dem höheren Zuwachs (resp. geringerem Verlust); für jede der beiden Halbgruppen wurde festgestellt, wieviel offene und geschlossene Ohrstanzlöcher an dem Tag vorhanden waren, an dem die mittlere logarithmische Heilung ermittelt wurde. Bei Monotherapie finden sich in den Gruppen AMC und VBS, die zu der deutlichsten Gewichtsreduktion geführt hatten, diese und die Stanzlochabheilungshemmung korreliert mit Irrtumswahrscheinlichkeiten unter 5 %. Mit gleicher Wahrscheinlichkeit ist in der 5-FU-Gruppe das Gegenteil der Fall! Bei Kombinationsbehandlung mit L-A ist eine positive Korrelation zwischen Körpergewichtszuwachs und Wundheilung bei AMC, PSH, VBS und ZPA festzustellen. Die negative Korrelation bei 5-FU ist jetzt eingeebnet, was im Grunde auch darauf hinweist, daß bei L-A-Kombinationsbehandlung Körpergewichtsänderung und Stanzlochheilung denselben Gang haben.

Fazit: L-A bewirkt wie die anderen verwendeten Zyto-
statika Absterberaten, Reduktion des Körpergewichts-
zuwachses und Hemmung der Stanzlochheilung im Ohr-
stanzlochtest, wobei es in Mehrfachchemotherapie die
beiden letzteren Parameter deutlicher korreliert wer-
den läßt.

V. Diskussion

Nach innerhalb von 15 Tagen intraperitoneal in gleichen täglichen Einzelportionen applizierten Gesamtdosen von 120 TE (= % der LD 50/30) von Aktinomyzin C (AMC), 5-Fluorurazil (5-FU), Podophyllinsäurehydrazid (PSH), Vinblastinsulfat (VBS) und Zyklophosphamid (ZPA) kommt es substanzabhängig zu verschiedenen Absterberaten, variierender Reduktion des Körpergewichtszuwachses und unterschiedlicher Hemmung der Abheilung vor Beginn der zytostatischen Behandlung gesetzter Stanzlöcher in Mäuseohren. Dies und die Tatsache, daß die angeführten drei Parameter nicht von Substanz zu Substanz streng korreliert sind, beweist die Schwierigkeiten der Versuche einer aequitoxischen Dosierung mehrerer Chemotherapeutika. Nach in gleichem Rhythmus gegebenen insgesamt 12 000 IU/kg L-Asparaginase (L-A) kommt es zu Absterberaten, Hemmung von Gewichtszuwachs und Ohrstanzlochabheilung in einem Ausmaß, das sich innerhalb der nach 120 TE der genannten anderen Zytostatika festgestellten Grenzen bewegt. Simultane Kombinationsbehandlung führt nur bei 5-FU + L-A, PSH + L-A und VBS + L-A zu einer Zunahme der Absterberaten gegenüber 5-FU, PSH, VBS oder L-A alleine, und zu einer Zunahme der Reduktion des Gewichtszuwachses zu einem früheren Zeitpunkt in allen fünf Kombinationen gegenüber AMC, 5-FU, PSH, VBS oder ZPA alleine, zu einem späteren Zeitpunkt nur noch bei 5-FU + L-A und ZPA + L-A, gegenüber L-A in den Gruppen AMC + L-A und VBS + L-A, wie gering auch ZPA + L-A. Im Ohrstanzlochtest verschieben die Kombinationen AMC + L-A und PSH + L-A die Abheilung gegenüber AMC, PSH wie L-A wesentlich, die Kombinationen 5-FU + L-A nur gegenüber 5-FU, ZPA + L-A wesentlich nur gegenüber L-A, während die Hemmung nach VBS + L-A gegenüber VBS und L-A nur anfänglich sich ausprägt. Zusätzliche L-A-Medikation läßt das Ausmaß der Abnahme des Gewichtszuwachses und desjenige der Abheilungshemmung im Ohrstanzlochtest deutlich korrelierter werden.

Auf jeden Fall gibt es keinen vernünftigen Grund, L-A nicht sowohl in Bezug auf seine Effekte auf Absterbeordnung und Körpergewichtszuwachs, als auch im Ohrstanzlochversuch ähnliche bis gleiche Wirkung zuzuordnen wie dem Antibiotikum AMC, dem Antimetaboliten 5-FU, den Antimitotika PSH und VBS oder dem Alkylans ZPA.

Mehrfachchemotherapie, derzeit die Methode der Wahl bei akuten Leukaemien, wird vielfach schon bei anderen onkologischen Palliativvorhaben verwendet (SCHMIDT 1969). Dabei werden die bedeutenden Unterschiede, die zwischen den Wirkungsmechanismen von Alkylantien, Aktinomyzinen, Uridin- und Hypoxanthinanaloga, Halogenpyrimiden, Folsäureantagonisten, Spindelgiften etc. bestehen in dem Sinne ausgenutzt, daß es bei Addition der therapeutischen Hauptwirkungen zu Subaddition der unerwünschten Nebeneffekte kommt. Bei allen bedeutenden Wirkungsunterschieden dieser Agentien stören sie doch alle zelluläre Bestandteile, alterieren deren Struktur, veranlassen den Verlust der Proliferationsfähigkeit und bewirken schließlich den Zelltod; dabei sind Effekte auf DNS- und Proteinsynthese wie den Mitoseablauf vordergründig, und es ist vielfach nur eine Dosisfrage, welche Stellen metabolischer Wege blockiert werden (BIESELE; ISSEKUTZ; KLIGERMANN; KNOCK; MEYTHALER; SELLEI et al.; VERMUND et al.). Proliferationshemmende und damit auch onkostatistisch wirksame Nukleotoxine nannten HEILMEYER 1946 Zytostatika und DUSTIN sen. 1947 Radiomimetika. Letzterer Begriff wird vielfach gerne enger definiert nur auf die Alkylantien wegen deren relativ unspezifischen Eingreifens in den Zellmetabolismus beschränkt (BIESELE; FEINE; MEYTHALER). Wir möchten jedoch BACQ und ALEXANDER folgen und die beiden Termini Zytostatika und Radiomimetika als synonym ansehen, da sie zu einem strahlenähnlichen biologischen Endergeb-

nis führen. Es fragt sich nun, ob man unter die Radiomimetika im weiteren Sinn auch das Malignomtherapeutikum L-A einordnen kann. Als die Substanz aufkam, schien es so, als habe eine neue Ära der Krebschemotherapie begonnen. Man hatte die Hoffnung, daß sich als asparaginasesensibel nur ganz speziell einige maligne Zellarten herausstellen würden. Dem ist jedoch nicht so. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß GERHARTZ und BEGEMANN bei 109 Fällen unter der L-A-Behandlung 43 Leukopenien und 31 Anaemien beobachteten, also nicht nur Leberschädigung und auf diese schließlich zurückzuführende haemorrhagische Diathese durch Fibrinogenmangel. Wir sehen jetzt, daß L-A im Ohrstanzlochtest die Wundheilung reproduzierbar hemmt, des weiteren, daß L-A die durch andere Zytostatika eingetretene Hemmung in Kombinationsversuchen noch kumulativ verstärkt. Wir möchten das mit BUCH darauf zurückführen, daß die Ohrstanzlochheilung von einer Proteinsynthese abhängig oder aber von ihr begleitet ist, die asparaginasesensibel ist und durch das Enzym gestört wird. Damit findet die Ansicht von GERHARTZ und BEGEMANN sich bestätigt, L-A führe zu einer recht allgemeinen Retardierung des Zellstoffwechsels, und es ist unseres Erachtens berechtigt, L-A auch als Radiomimetikum im weiteren Sinne zu bezeichnen. Es ist eine zytostatische Substanz mit relativ gezielter therapeutischer Hauptwirkung, dabei einen bedeutenden Nebenwirkungsspektrum, das anders zusammengesetzt ist, als wir es von älteren und üblicheren Zytostatika gewohnt sind.

VI. Zusammenfassung

Ein die Abheilungsgeschwindigkeit von Stanzlöchern in Mäuseohren hemmender Effekt wurde für Aktinomyzin C, 5-Fluorurazil, Podophyllinsäurehydrazid, Vinblastinsulfat und Zyklophosphamid wie auch L-Asparaginase früher in der Arbeitsgruppe nachgewiesen und jetzt reproduziert. Wurden 15 mal 8 % der DL 50/30 der ersten Substanzen in 15 Tagen mit 15 mal 800 IU/kg L-Asparaginase i.p. kombiniert, ergab sich eine gesicherte zusätzliche Stanzlochheilungshemmung von der 2. bis in die 5. Beobachtungswoche bei Aktinomyzin C und Podophyllinsäurehydrazid, bei 5-Fluorurazil von der 4. bis zur 7., bei Vinblastinsulfat während der 2. und bei Zyklophosphamid der 5. Beobachtungswoche nach Stanzung und Therapiebeginn. Dieser kumulative Effekt wird darauf zurückgeführt, daß die gewebliche Reaktion granulierender Gewebe von einer Proteinsynthese abhängt oder von ihr begleitet ist, die asparaginasesensibel ist und durch das Enzym gestört wird. Damit bestätigen wir neuere Ansichten, L-Asparaginase führe zu einer recht allgemeinen Retardierung des Zellstoffwechsels.

VII. Literaturverzeichnis

- Alinis, A., H.M. Kurtz, P.I. Kramer, H.E. Weimer,
R.M. Ryan u. E. Jameson:
Cancer Res. 18, 1309, 1958
- Arnold, H., F. Bourseaux u. N. Brock:
Naturwissenschaften 45, 64, 1958
- Asta-Werke AG, Brackwede:
Endoxan-Sammelreferate 1, 1961 - 10, 1969
- Bacq, R.M., u. P. Alexander:
Fundamentals of radiobiology. 2. Ed.
Oxford-London-New-York-Paris 1961
- Bauer, K.H.:
Das Krebsproblem. 2. Aufl.
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963
- Becker, F.F., u. J.D. Broome:
Science 156, 1602, 1967
- Beer, C.T.:
Brith. Empire Cancer Campaign, 33rd Ann. Rep., 487, 1955
- Bently, R.:
Pharm. J. and Trans. 3, 456, 1861
- Bettigole, R.E., E.S. Himmelstein, H.F. Oettgen
u. G.O. Clifford:
Clin. Res. 17, 399, 1969
- Bieseke, J.J.:
Mitotic poisons and the cancer problem.
Amsterdam-Houston-London-New York 1958
- Boyse, E.A., L.J. Old, H.A. Campbell u. L.T. Masburn:
J. exp. Med. 125, 17, 1967
- Brock, H., u. H.-J. Hohorst:
Arzneimittel-Forsch. 13, 1021, 1963
- Brockmann, H., u. N. Grubhofer:
Naturwissenschaften 36, 376, 1949
- Brockmann, H., u. N. Pfennig:
Naturwissenschaften 39, 429, 1952
- Broome, J.D.:
Nature 191, 1114, 1961
- Buch, E.:
Inaug.-Diss.med. Gießen 1970
- Bullock, E., u. W. Johnson:
J. chem. Soc. 3, 3280, 1957
- Clementi, A.:
Arch. int. Physiol. 19, 369, 1922
- Duschinsky, R., E. Plaven u. J. Scheiner:
Nature 179, 663, 1957

- Dustin, A.P.:
Nature 159, 794, 1947
- Feine, U.:
Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin
und Krebsforschung. Ergebnisse 1952-1958. S. 943.
Stuttgart 1959
- Gmaehl, E. (Hergb.):
Internationales Symposium über die Anwendung der
Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin.
Berlin-München-Wien 1969
- Grundmann, E., u. H.F. Oettgen (Hergb.):
Experimental and clinical effects of L-asparaginase.
Recent results in Cancer research. Vol.33.
Berlin-Heidelberg-New York 1970
- Harbers, E.:
Strahlentherapie Sonderbd. 57, 182, 1964
- Hartwell, I.L. u. A.W. Schrecker:
J. Amer. chem. Soc. 72, 3320, 1950; 73, 2909, 1951
- Heidelberger, C.:
Nach Plattner
- Hein, R.R., J. Freiberg u. G. Gehrman:
Dtsch. med. Wschr. 95, 989, 1970
- Heite, H.J.:
Arzneimittel-Forsch. 5, 151, 1955
- Heite, H.J. u. K.H. Nikolai:
Strahlentherapie 11, 455, 1956
- Hoppe, L.:
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 68, 259, 1962
- Horowitz, B., B.K. Madras, A. Meister, L.J. Old, E.A.
Boyse u. E. Stokkert:
Science 160, 533, 1968
- Issekutz sen., B.:
The chemotherapy of cancer.
Budapest 1969
- IUB:
Recommendation 1964 of the IUB in: Enzyme Nomenclature.
Amsterdam-London-New-York 1969
- Jameson, E., H. Alinis u. R.M. Ryan:
Science 124, 980, 1956
- Junge-Hülsing, G., H. Wagner, U. Müller, H. Müller,
T. Büchner u. W.H. Hauss:
Arzneim.-Forsch. 20, 777, 1970
- Kaplan, J.W.:
New Orleans M. and S.J. 94, 399, 1942
- Karrer, K.:
3. Intern. Kongr. Chemother., Stuttgart 1963, 2. Bd.,
S. 1081

- Kersten, W.:
Biochem. biophys. Acta 47, 610, 1961
- Kidd, J.G.:
J.exp.Med. 98, 565, 1953
- u. J.E. Todd:
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y. 86, 781, 1954)
- Kim, J.H., E.A. Boyse, L.J. Old, H.A. Campbell:
Biochem. biophys. acta 158, 476, 1968
- Kligerman, M.A.:
Progress in radiation therapy. Hergb. v. F. Buschke.
3. Bd., S. 183
- Knock, F.E.:
Anticancer agents.
Springfield/III. 1967
- Lettré, H., u. S. Witte:
Experimentelle und klinische Erfahrungen mit Podo-
phyllinderivaten in der Tumorthherapie.
Stuttgart 1967
- Mashburn, L.T., u. J.C. Wriston jr.:
Arch. Biochem. 105, 450, 1964
- Meythaler, F. (Hergb.):
In: Therapie maligner Tumoren. Hergb. v. E. Holder,
F. Meythaler u. R. du Mesnil de Rochemont. 1. Bd.,
S. 343, Stuttgart 1966
- Miller, K.H., J.S. Salser u. M.E. Balis:
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 9, 49, 1968
- Neuss, N., M. Gorman, H.E. Boaz u. N.J. Cone:
J. Amer. Chem. Soc. 84, 1509, 1962
- Noble, R.L., C.T. Beer u. J.H. Cutts:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 76, 882, 1958
- Old, L.J., E.A. Boyse, H.A. Campbell, R.S. Brodey,
J. Fidler u. J.D. Teller:
Cancer 20, 1066, 1967
- Plattner, P.A.:
Chemotherapy of cancer.
Amsterdam-London-New-York 1964
- Prager, M.D., N. Bachynsky:
Biochem. biophys. Res. Commun. 31, 43, 1968
- Prager, M.D., P.C. Peters, J.O. James u. J. Derr:
Nature 221, 1064, 1969
- Quast, E.:
Inaug.-Diss.med. Gießen 1967
- Ramadan, M.E.A., F. El Asmar u. D.M. Greenberg:
Arch. Biochem. 108, 143, 1958

- Rausch, L.:
Strahlentherapie 127, 393, 1965
- u. E. Ander:
Sonderbd. 62 zur Strahlentherapie, 198, 1966
- , G. Breitling u. E. Unger:
Strahlentherapie 117, 377, 1962
- Ringleb, D.:
Habil.-Schrift med. Gießen 1967
- :
Strahlentherapie 135, 597, 1968a
- :
Strahlentherapie 135, 618, 1968b
- :
Strahlentherapie 136, 82, 1968c
- :
Fortschr. Mediz. 86, 51, 1968d
- :
In: Fortschritte der Krebsforschung. Hergb. v. C.G.
Schmidt u. O. Wetter. Stuttgart-New York 1969, S. 197
- :
Vorbestrahlung und zytostatische Vorbehandlung.
Dtsch. Röntgenkongress 1970 München
- , M. Bosnar, R. Krieg, D. Sauer u. R. Steckenmesser:
Strahlentherapie 138, 218, 1969a
- u. E. Buch:
Strahlentherapie (im Druck) 1971a
- u. H.G. Grundner:
Strahlentherapie 136, 320, 1968
- , R. Krieg u. D. Sauer:
Strahlentherapie 139, 432, 1969b
- , R. Krieg u. R. Steckenmesser:
Strahlentherapie 137, 680, 1969c
- , L. Kratz u. W. Sippel:
Strahlentherapie 140, 687, 1970
- u. W. Sippel:
Strahlentherapie (im Druck) 1971b
- Rowley, B. u. J.C. Wriston jr.:
Biochem. biophys. Res. Commun. 28, 160, 1967
- Rutschmann, J. u. J. Renz:
Helv. chim. acta 42, 890, 1959
- Sauer, D.:
Inaug.-Diss. med. Gießen 1968
- Schaudig, H.:
Langenbecks Arch. klin. Chir. 301, 738, 1962

Schmidt, C.G.:

Krebsarzt 24, 129, 1969

-- u. W.M. Gallmeier:

Dtsch. med. Wschr. 93, 2299, 1968

In: Fortschritte auf dem Gebiet der Krebsforschung.

Hergb. v. C.G. Schmidt u. O. Wetter, Stuttgart-New York
1969, S. 67

Schmähl, D.:

Dtsch. med. Wschr. 94, 2249, 1969

Schneider, E.:

Inaug.-Diss. med. Gießen 1967

Schreck, R., W.C. Dolowy u. R.N. Ammerall:

Science 155, 329, 1967

Schrecker, A.W., u. I.L. Hartwell:

J. Amer. chem. Soc. 75, 5916, 1953; 76, 752, 1954;

77, 432 u. 6725, 1955

Schulten, H.K., G. Giraldo, E.A. Boyse u. H.F. Oettgen:

Lancet 1969/II, 644

Schwartz, R.S.:

Nature 224, 275, 1969

Sellei, C., S. Eckhardt u. L. Németh:

Chemotherapy of neoplastic diseases.

Budapest 1970

Shapiro, D.M.:

Radiology 69, 188, 1957

Sippel, W.:

Inaug.-Diss. med. Gießen 1971

Slotnick, J.:

Antibiot. and Chemother. 8, 476, 1958

Steckenmesser, R.:

Inaug.-Diss. med. Gießen 1968

Stern, H.W., W.M. Gallmeier u. C.G. Schmidt:

Dtsch. med. Wschr. 94, 253, 1969

Vermund, H., F.F. Gollin:

Cancer 21, 58, 1968

Lebenslauf

26.2.1939 geb. in Königsberg/Pr. als Sohn des Industrie-Prokuristen Kurt G. Haeger und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Puddig

April 1946 Besuch der Volksschule in Salzgitter-Bad

April 1951 Besuch des Gymnasiums in Salzgitter-Bad und
bis März 1957 Salzgitter-Lebenstedt

April 1957 Lehrausbildung zum Steuerpraxisassistenten in
bis März 1960 Salzgitter-Bad in der väterlichen Steuerpraxis

September 1960 Besuch des Abendgymnasiums in Braunschweig

April 1964 Erlangung der Hochschulreife

SS 1964 Studium an der Med. Fakultät der Justus Liebig-Universität

Februar 1967 Physikum

Sept. 1970 Staatsexamen

seit Okt. 1970 Medizinalassistent an den Kliniken der Justus Liebig-Universität Gießen

Volkmar Haeger

**FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449**